

УДК 535.3; 54.08

© А. В. Калинин, В. Н. Титов

КАЛИБРОВКА (РЕГРЕССИЯ) СПЕКТРОМЕТРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ТРИГЛИЦЕРИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ПРОДУКТАХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Триглицериды жирных кислот (ТГЖК) составляют важную часть питания человека. Спектрометрия ТГЖК имеет очевидные преимущества перед традиционной хроматографией и возможна с применением по крайней мере трех типов спектрометров ближнего инфракрасного диапазона. В статье приведены результаты калибровки названных спектрометров методом регрессии на латентные структуры для определения содержания клинически значимых ТГЖК в пище, препаратах и сыворотке крови кардиологических пациентов.

Кл. сл.: жирные кислоты, ближняя инфракрасная спектрометрия, регрессия на латентные структуры

ВВЕДЕНИЕ

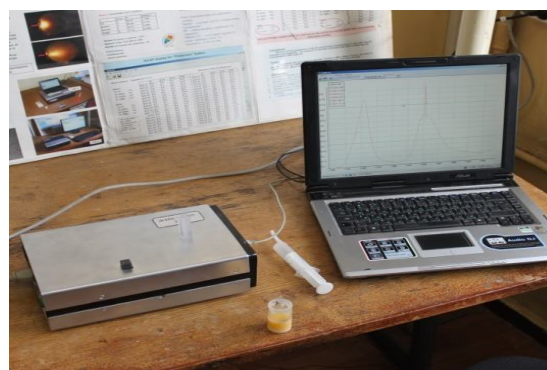
Триглицериды жирных кислот (ЖК) являются существенными компонентами диеты человека, обладая при этом уникальной биологической активностью [1]. Содержание клинически важных ЖК и индивидуальных триглицеридов в пище и в биологических средах традиционно определяют способами газовой и жидкостной хроматографии [2]. Из-за сложности и дорогостоящести эти методы труднодоступны для лабораторий клинической биохимии. Кроме того, распространение в продаже фальсификатов жирно-масляных продуктов питания приводит к потребности в портативном и оперативном анализаторе ряда характерных ЖК.

ЗАДАЧИ РАЗРАБОТКИ

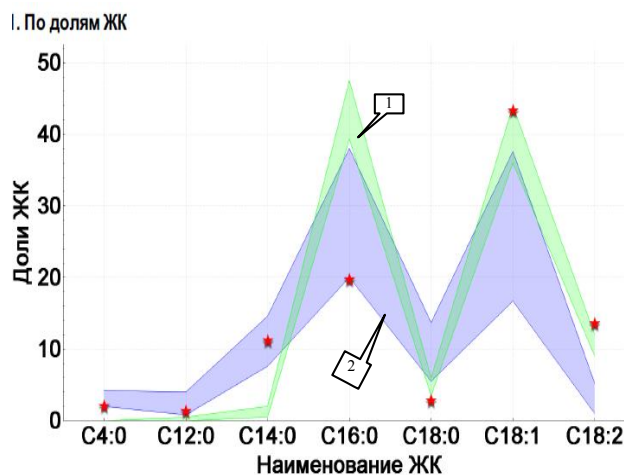
Оценка возможностей БИК-спектрометра

Первая цель — адаптировать метод проекций на латентные структуры (ПЛС) [3] для оперативного определения содержания ЖК, в первую очередь пальмитиновой насыщенной и олеиновой мононенасыщенной ЖК, а также суммы полиеновых (эйкозапентаеновая + докозагексаеновая) ЖК в продуктах питания, пищевых добавках, рыбном жире с применением спектрометра ближнего инфракрасного (БИК) диапазона на линейке InGaAs фотодиодов, фото и протокол измерения которого представлены на рис. 1 [4].

При тестировании калибровок БИК-спектрометра, являющегося прототипом портативного анализатора для пальмитиновой и олеиновой, а также суммы полиеновых ЖК, достигнуты значения множественного коэффициента корреляции



а



б

Рис. 1. Портативный БИК-спектрометр (а) и протокол определения 7 ЖК в среде с его помощью (б). Звездами обозначены доли ЖК, 1 — поле возможных значений ЖК в пальмовом масле, 2 — в молочном жире

0.89, 0.85 и 0.96 и стандартной ошибки 0.53, 1.43 и 0.39 % соответственно, что доказывает применимость метода для экспресс-анализа продуктов питания [5].

Разработка технологии оперативного анализа

Вторая цель — разработать технологию оперативной оценки в сыворотке крови содержания клинически важных триглицеридов пальмитиновой насыщенной, олеиновой мононенасыщенной и других ЖК на основе ПЛС-калибровки. Стандартизацию состава и содержания триглицеридов ЖК в образцах сыворотки крови для калибровки провели с традиционной экстракцией, метилированием и разделением индивидуальных ТГ с помощью высокоэффективного жидкостного хрома-

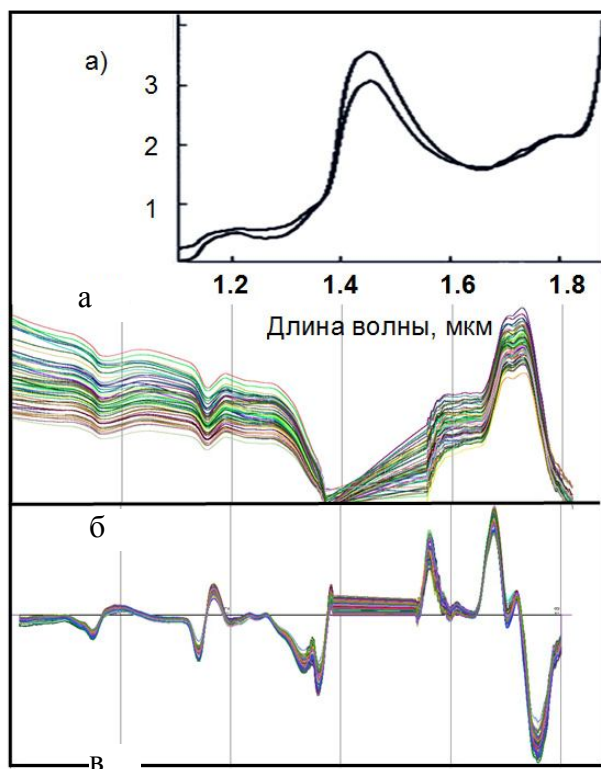


Рис. 2. Графики спектральных значений, а — коэффициенты поглощения (мм^{-1}) различных дистиллятов воды (в логарифмической шкале); б — оптическая плотность 27 образцов сыворотки; в — продифференцированные кривые оптической плотности тех же образцов (видны вариации спектров, отнесенные к колебаниям, характерным для С–Н и С=C связей)

тографа DIONEX Ultimate 3000 с использованием колонки Reprosil-Pur с наполнителем C18-AQ 3 мкм, 150×4.6 мм. В качестве детектора использовали масс-спектрометр модели ABSCIEX QTRAP 5500 при работе в режиме регистрации позитивно заряженных ионов. Спектры стандартизованных образцов сыворотки получены с применением фурье-спектрометра МРА (Брукер, Германия) в диапазоне длин волн 1.0–2.2 мкм. Они иллюстрируются на рис. 2, б, для тех же длин волн, что и спектр поглощения доминирующей в сыворотке воды — рис. 2, а. Построенные по их производным (рис. 2, в) ПЛС-модели были проверены стандартными образцами, не включенными в калибровку, и получены доказательства достоверного и селективного (в соответствии с [6]) количественного анализа названных ЖК в сыворотке крови без пробоподготовки. В результате сравнения калибровочных моделей для фурье-спектрометра в различных участках БИК-диапазона (по различным обертонам и комбинациям поглощения ЖК в сыворотке) был выбран спектральный диапазон 1.0–1.88 мкм в качестве оптимального для портативного спектрометра на базе линейки InGaAs фотодиодов. Кроме того, с применением спектрометра комбинационного рассеяния выполнена оценка содержания пальмитиновых и олеиновых триглицеридов в средах с небольшим (до 8 %) присутствием воды.

Решение двух вышеизложенных задач позволило подготовить главный результат: прослеживание 4 ЖК в пище и в сыворотке 38 пациентов показало нарушения метаболизма ЖК у 27 и состава ферментов у 16. Их регулирование в течение 2 недель привело к облегчению сердечно-сосудистого состояния у 23 пациентов. С позиций общей биологии явно позитивно, если взрослые, особенно пожилые, откажутся от потребления сливочного жира и уменьшат в пище содержание продуктов, богатых пальмитиновой ЖК: говядины, сметаны, жирных сыров. Это реальный шаг в профилактике метаболических пандемий (атеросклероз и атероматоз, метаболический синдром, резистентность к инсулину, ожирение). В связи с новыми представлениями о патогенезе атеросклероза в свете филогенетической теории общей патологии [7] особое диагностическое значение имеет отношение ЖК C16:0/C18:1 и C16:0/C18:2 в плазме крови и тканях. В настоящей работе показано, что это отношение можно оперативно диагностировать с применением БИК-спектрометра в диапазоне длин волн 1.0–1.88 мкм (см. таблицу).

Параметры тестирования моделей по спектрам 123 образцов для определения триглицеридов (ТГ), холестерина (Ch) и 4 ЖК

K, L	Н	TG			Ch			C16:0			C18:1			C18:2			C20:4		
		n	r^2_p	σ	n	r^2_p	σ	n	r^2_p	σ	n	r^2_p	σ	n	r^2_p	σ	n	r^2_p	σ
1+2+4(55, 22)	GSDer	6	0.94	1.37	5	0.86	1.49	8	0.85	119	7	0.86	194	8	0.81	183	7	0.81	102
2+1 (30, 25)	GSDer	5	0.83	1.36	5	1.79	0.61	9	0.86	117	7	0.84	126	8	0.83	112	10	0.76	113
	2GSDer	9	0.96	1.81	4	1.69	0.65	8	0.87	118	7	0.86	226	8	0.85	141	12	0.82	122
2+3 (26, 42)	Rb	10	0.87	1.4	9	0.87	10.42	6	0.91	215	7	0.91	222	7	0.93	121	10	0.61	128
	GSDer	7	0.96	1.23	5	0.88	1.4	2	0.93	112	2	0.91	122	4	0.93	114	9	0.63	118
	2GSDer	10	0.81	1.55	12	0.77	1.56	2	0.92	113	2	0.91	124	2	0.91	116	8	0.63	118
2+4 (39, 25)	GSDer	7	0.96	1.23	5	0.88	1.4	2	0.93	112	2	0.91	122	4	0.93	112	9	0.63	121
	2GSDer	10	0.81	1.55	12	0.77	1.56	2	0.92	113	2	0.91	124	3	0.91	118	10	0.64	118

Примечание. K — число калибровочных, а L — число тестирующих образцов; Н — способ обработки спектров: GSDer и 2GSDer (сглаживание и дифференцирование спектра 1 или 2 раза), Rb — удаление базовой линии; n — число латентных переменных (сложность модели); r^2_p — коэффициент множественной корреляции; σ_s — среднее квадратичное отклонение

Благодарности

Авторы глубоко благодарны Е.А. Юровой, к.т.н., зав. лабораторией техникохимического контроля ВНИИ молочной промышленности РАН за предоставление стандартных образцов пищевых жиромасляных смесей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Титов В.Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. М., Тверь: ООО "Изд-во "Триада", 2008. 272 с.
2. Орлова Т.И., Уколов А.И., Савельева Е.И., Радлов А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 2. С. 183–188. Doi: 10.15826/analitika.2015.19.2.002.
3. Wold S., Sjostrom M., Eriksson L. PLS regression: a basic tool of chemometrics // Chem. Intelligent. Lab. Syst. 2001. Vol. 58, no. 2. P. 109–130. Doi: 10.1016/S0169-7439(01)00155-1.
4. Kalinin A.V., Krashennnikov V.N. Detection of fatty product falsifications using a portable near Infrared spectrometer // EPJ Web of Conferences. 2017. Vol. 132, no. 02009. Doi: 10.1051/epjconf/201713202009.
5. Калинин А.В., Крашенинников В.Н., Свиридов А.П., Титов В.Н. Определение содержания диагностически

значимых жирных кислот и индивидуальных триглицеридов в биологических средах на основе инфракрасной спектроскопии // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 11. С. 13–20.

6. Westad F., Schmidt A. and Kermit M. Incorporating chemical band-assignment in near infrared spectroscopy regression models // J. Near Infrared Spectrosc. 2008. Vol. 16, no. 3. P. 265–273. Doi: 10.1255/jnirs.786.
7. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Сахарный диабет. М.: ИНФРА-М, 2014. 223 с.

Институт спектроскопии РАН, Москва, Троицк
(Калинин А.В.)

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ, Москва (Титов В.Н.)

Контакты: Калинин Андрей Валентинович,
kalinin@isan.troitsk.ru

Материал поступил в редакцию 28.06.2018

CALIBRATION (REGRESSION) OF SPECTROMETERS FOR DETERMINATION OF TRIGLYCERIDES OF FATTY ACIDS IN FOODS AND SERUM

A. V. Kalinin¹, V. N. Titov²

¹*Institute for Spectroscopy of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Troitsk, Russia*

²*National Medical Research Cardiology Center of the Ministry of Health of the RF, Moscow, Russia*

Triglycerides of fatty acids (TGFA) form an important part of human nutrition. The spectrometry of TGFA has obvious advantages over conventional chromatography and is possible with at least three types of near-infrared spectrometers. The report presents the results of calibration of these spectrometers by the regression method on latent structures to determine the content of clinically significant TGFA in food, preparations and blood serum of cardiac patients.

Keywords: fatty acids, near infrared spectrometry, regression to latent structures

REFERENCES

1. Titov V.N. *Klinicheskaya biohimiya zhirnyh kislot, lipidov i lipoproteinov* [Clinical biochemistry of fatty acids, lipids and lipoproteins]. Moscow, Tver, Triada Publ., 2008. 272 p. (In Russ.).
2. Orlova T.I., Ukolov A.I., Savel'eva E.I., Radilov A.S. [GC-MS quantification of free and esterified fatty acids in blood plasma]. *Analitika i kontrol* [Analytics and control], 2015, vol. 19, no. 2, pp. 183–188. Doi: 10.15826/analitika.2015.19.2.002. (In Russ.).
3. Wold S., Sjostrom M., Eriksson L. PLS regression: a basic tool of chemometrics. *Chem. Intelligent. Lab. Syst.*, 2001, vol. 58, no. 2, pp. 109–130. Doi: 10.1016/S0169-7439(01)00155-1.
4. Kalinin A.V., Krashennnikov V.N. Detection of fatty product falsifications using a portable near Infrared spectrometer. *EPJ Web of Conferences*, 2017, vol. 132, no. 02009. Doi: 10.1051/epjconf/201713202009.
5. Kalinin A.V., Krashennnikov V.N., Sviridov A.P., Titov V.N. [The detection of content of diagnostically significant fatty acids and individual triglycerides in biological mediums based on infrared spectrometry]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* [Russian Clinical Laboratory Diagnostics], 2015, vol. 60, no. 11, pp. 13–20. (In Russ.).
6. Westad F., Schmidt A. and Kermit M. Incorporating chemical band-assignment in near infrared spectroscopy regression models. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 2008, vol. 16, no. 3, pp. 265–273. Doi: 10.1255/jnirs.786.
7. Titov V.N. *Filogeneticheskaya teoriya obshchej patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemij. Saharnyj diabet* [Phylogenetic theory of the general pathology. Pathogenesis of metabolic pandemics. Diabetes]. Moscow, INFRA-M Publ., 2014. 223 p. (In Russ.).

Contacts: *Kalinin Andrey Valentinovich*,
kalinin@isan.troitsk.ru

Article received in edition 28.06.2018